

Pět nejvýznamnějších prací pro rozvoj oboru ke dni 30. 4. 2022
doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

1. Shimizu T., Lengalova A., Martínek V., Martínková M.: Heme: Emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres, *Chem. Soc. Rev.* 2019, 48, 5624 - 5657. IF₂₀₁₉ = 42.846. (49 times cited)

Ve výběru pěti nejvýznamnějších publikací na prvním místě uvádím přehledný článek, který vzbudil u odborné veřejnosti velký ohlas a prakticky každá nová práce na téma hemových sensorových proteinů jej cituje. Komplex atomu železa v různých oxidačně-redukčních stavech a protoporphyrinu IX se nazývá hem. Tento kofaktor je důležitý pro přenos a ukládání kyslíku, aktivaci kyslíku a přenos elektronů, pokud je tento kofaktor vázán v hemoproteinech jako hemoglobin, myoglobin, cytochrom P450 a cytochrom *c*. Kromě právě zmíněných prototypických hemových proteinů a klasických rolí hemu v těchto hemoproteinech, byly nedávno popsány také nové, naléhavé, kritické role labilního (volného) hemu při přenosu signálu. Je pravděpodobné, že asociace/disociace hemu na/z hemové sensorové proteiny reguluje četné funkce, včetně transkripce, vazby na DNA, sestřihu mikroRNA, translace, aktivity proteinkinas, degradace proteinů, degradace hemu, funkce K⁺ kanálu a mnoho dalších procesů a funkcí. Uvedený přehledný článek poskytuje komplexní přehled o vztahu struktury a funkce hemových sensorových proteinů, které detekují hem. Dále jsme se také pokusili popsat nové, další role labilního (volného) hemu jako funkčního inhibitoru a/nebo aktivátoru. Zmiňujeme hem jako nové centrum chemické reakce pro aldoximdehydratasu, cis–trans izomerasu, procesů tvorby hydrazinu, N–N nebo S–S vazby a další funkce. Vzhled do základních molekulárních mechanismů je nezbytný pro pochopení nové role hemu v důležitých fyziologických a patologických procesech. Právě důraz na vysvětlení základních chemicko-fyzikálních vlastností této skupiny hemoproteinů pro využití biologů, lékařů a dalších vědců z aplikační sféry výzkumu činí tento příspěvek unikátní.

2. Miksanova M., Igarashi J., Minami M., Sagami I., Yamauchi S., Kurokawa H, Shimizu T.: Characterization of Heme-regulated eIF2 α Kinase: Roles of the N-terminal Domain in the Oligomeric State, Heme Binding, Catalysis, and Inhibition, *Biochemistry*, 2006, 45, 9894-905. IF₂₀₀₆ = 3,633. (49 times cited).

Jedním ze zástupců hemových sensorových proteinů, které detekují hem a kterému se naše výzkumná skupina intenzivně a dlouhodobě věnuje, je tzv. inhibitor regulovaný hemem. Tento protein se skládá ze dvou domén – sensorové domény lokalizované na N-terminální straně a funkční domény na C-konci. Funkční doména vykazuje kinasovou enzymovou aktivitu vůči eukaryotickému iniciačnímu faktoru 2 α , zatímco sensorová doména reguluje tuto enzymovou aktivitu funkční domény v závislosti na přítomnosti signálu, kterým je změna koncentrace hemu. Tato práce odhalila, že sensorová doména je zapojena do rozpoznávání substrátu funkční domény, která vykazuje kinasovou aktivitu vůči eukaryotickému iniciačnímu faktoru 2 α . Navíc bylo zjištěno, že odstranění sensorové domény ze struktury inhibitoru regulovaného hemem změnilo hexamerní oligomerní strukturu na strukturu tvořenou trimerem. Unikátním přínosem jmenované práce pro pochopení mechanismu interakce modelového sensorového proteinu s heme, bylo prokázání, že pouze jediná molekula Fe(III)-heminu stejně jako Fe(II)-hemu interaguje s inhibitorem regulovaným hemem. Interakci jediné molekuly hemu jsme popsali také pro deleční mutant Δ 145, který vůbec neobsahuje sensorovou doménu. Všechna tato zjištění dovolila vyvodit závěr a vytvořit model interakce studovaného sensorového proteinu s hemem.

Tento model počítá s jedním axiálním ligandem hemu v sensorové doméně a druhým v doméně funkční inhibitoru regulovaného hemem. Závěry této práce pak přispěly k finalizaci popisu a pochopení interakci studovaného sensorového proteinu se signální molekulou (s hemem). Bylo zjištěno, že axiální ligand hemu lokalizovaný v sensorové doméně je buď His-119 a/nebo His-120. Tyto dva histidylové zbytky se mohou vzájemně nahrazovat a podtrhují typickou vlastnost všech sensorových proteinů obsahujících hem, to je velkou flexibilitu proteinové molekuly. Druhý axiální ligand hemu lokalizovaný naopak ve funkční doméně byl identifikován jako Cys-409. Je zajímavé, že Cys-409 je součástí tzv. CP motivu ve funkční doméně. CP motiv je sekvence Cys a Pro seřazená za sebou, často se tento motiv v sensorových proteinech několikrát opakuje. Sousedství prolinu poskytuje cysteinu velmi unikátní charakter a moduluje jeho vlastnosti ve vztahu ke koordinaci hemu.

3. Shimizu T., Huang D., Yan F., Stranava M., Bartosova M., Fojtíková V., Martínková M.: Gaseous O₂, NO, and CO in Signal Transduction: Structure and Function Relationships of Heme-Based Gas Sensors and Heme-Redox Sensors, *Chem. Rev.* 2015, 115, 6491–6533. IF₂₀₁₅ = 37.369. (98 times cited)

Třetí vybraná práce má největší citační ohlas ze všech prací publikovaných naší výzkumnou skupinou. Věnuje se shrnutí nejdůležitějších poznatků z oblasti hemových sensorových proteinů, které nedetekují přímo hem (kterým se věnují první dvě uvedené nejvýznamnější práce), ale prostřednictvím relativně pevně vázaného hemu detekují plynné molekuly (O₂, NO, nebo CO). Jedná se tedy o hemové senzory plynů. Tyto proteiny potřebují pružně reagovat v případě, že detekují signál, a to je umožněno jejich velmi flexibilní strukturou, na rozdíl od struktury klasických (prototypických) hemoproteinů. Strukturu těchto hemoproteinů a jejich velkou konformační změnu způsobenou vazbou signální molekuly (plynu) na sensorovou doménu a přenos tohoto prvotního signálu do změny struktury funkční domény však lze většinou odvodit pouze z nepřímých experimentálních přístupů. V případě některých hemových sensorových proteinů jsou již známy struktury izolovaných sensorových a/nebo funkčních domén. Dosud ovšem bylo popsáno jen velmi málo trojrozměrných struktur kompletního (nezkráceného) hemového sensorového proteinu, který detekuje plyny. Obecně jsou experimenty s hemovými sensorovými proteiny s kompletním proteinovým řetězcem (tj. s jejich přirozenými variantami) velmi náročné. Zájem o pochopení mechanismu přenosu signálu v této skupině proteinů je přirozený a odráží touhu řešit klinické problémy neznámé příčiny v kombinaci s intuicí, že nějaká vážná onemocnění mohou být spojena s hemovými senzory plynů. Toto je pravděpodobně užitečná perspektiva, protože například lidská guanylátcyklasa (sensor NO) a cystathionin-β-synthasa (sensor CO) jsou hemové senzory plyných molekul, jejichž poškození může způsobit závažná onemocnění spojená s jejich enzymovou dysfunkcí. Protože stále přibývá nově popsaných hemových sensorových proteinů se schopností detekovat signální molekuly plynů, očekáváme, že budoucí studie odhalí další důležité souvislosti těchto proteinů s konkrétními onemocněními. Nicméně také bakteriální hemové sensorové proteiny, které detekují kyslík, jsou důležitým předmětem výzkumu v klinickém kontextu, protože představují zajímavé cíle pro návrh nových antibakteriálních a antimikrobiálních léků s minimálními vedlejšími účinky na eukaryotické organismy.

4. Stranava M., Man P., Skálová T., Kolenko P., Blaha J., Fojtíkova V., Martínek V., Dohnálek J., Lengalova A., Rosůlek M., Shimizu T., Martínková M.: Coordination and redox state-dependent structural changes of the heme-based oxygen sensor AfGcHK

associated with intraprotein signal transduction, *J. Biol. Chem.*, 2017, 292, 20921-20935. IF₂₀₁₇ = 4.011. (14 times cited).

Tato publikace z výčtu nejvýznamnějších publikací naší skupiny zásadně přispěla k tomu, že bakteriální hemový sensorový protein, který detekuje kyslík s názvem histidinkinasa s globinovou strukturou sensorové domény z půdní bakterie *Anaeromyxobacter* sp. kmen Fw109-5 (*AfGcHK*), je nejlépe prostudovaný protein ze skupiny hemových sensorů, které detekuje kyslík. Tvoří součást dvousložkového systému přenosu signálu v bakteriích. Vazba O₂ na komplex Fe(II)-hemu v jeho N-terminální sensorové (globinové) doméně silně stimuluje autofosforylaci na His-183 v jeho C-terminální funkční (kinasové) doméně. Šesti-koordinovaný ion železa hemu [buď Fe(III)-OH⁻ nebo Fe(III)-CN⁻ komplex] v sensorové doméně *AfGcHK* způsobí, že tyto formy jsou aktivní, ale pěti-koordinovaný ion železa hemu [Fe(II) komplex] a apoforma bez hemu v sensorové doméně jsou neaktivní. Určili jsme krystalové struktury izolovaných dimerních sensorových (globinových) ve stavu Fe(III)-CN⁻ (doména asociovaná s aktivní formou) a 5-koordinované Fe(II) formy (doména asociovaná s neaktivní formou), což odhalilo výrazné strukturální rozdíly na proximální straně sensorové domény (vůči rovině hemu). Zcela unikání ovšem byla studie plnodělkových (nezkrácených) forem daných proteinů aplikací metody vodík/deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií k charakterizaci konformačních změn spojených s přechodem z aktivní do neaktivní formy plnodělkového (nezkráceného) proteinu *AfGcHK* v roztoku. Takto jsme úplně poprvé pozorovali mechanismus přenosu intramolekulárního signálu u hemového sensorového proteinu. Hlavní rozdíly mezi aktivní a neaktivní formou byly patrné na proximální straně hemu (helix H5), na dimerizačním rozhraní (helixy H6, H7 a smyčka L7) sensorové (globinové) domény a ve vazebném místě pro ATP (helixy H9 a H11) funkční (kinasové) domény. V souladu s těmito pozorováními byl také fakt, že umělé oddělení sensorové a funkční domény, které deaktivuje enzymovou aktivitu daného senzoru, zvýšilo expozici rozpouštědla na rozhraní dimerizace sensorových domén (helix H6) a také flexibilitu a expozici rozpouštědla helixu H11. Tyto výsledky společně naznačují, že aktivní a neaktivní stav *AfGcHK* si můžeme představit jako uzavřené nebo otevřené nůžky. Signál pro aktivaci *AfGcHK*, vazba kyslíku k iontu železa hemu v sensorové doméně, vyvolá změnu v nejbližším okolí hemu, což způsobí změnu („uzavření“) dimerizačního rozhraní sensorové domény a tato změna je přenesena do domény funkční s následným přiblížením vazebního místa pro ATP blíže k His-183, který se snadněji autofosforyluje („nůžky se uzavřou“). Při disociaci kyslíku z hemu sensorové domény se *AfGcHK* deaktivuje a opačný sled kroků si lze představit jako „otevření nůžek“. Na modelovém příkladu byl tak úplně poprvé popsán mechanismus přenosu signálu v případě plnodělkového (nezkráceného) sensorového proteinu, který detekuje kyslík.

5. Skalova T., Lengalova A., Dohnálek J., Harlos K., Mihalcin P., Kolenko P., Stranova M., Bláha J., Shimizu T., Martínková M.: Disruption of the dimerization interface of the sensing domain in the dimeric heme-based oxygen sensor *AfGcHK* abolishes bacterial signal transduction, *J. Biol. Chem.* 2020, 295, 1587–1597. IF₂₀₂₀ = 5.157. (4 times cited).

Poslední z pěti nejvýznamnějších publikací je publikací nedávnou. Jedná se o práci, která bezprostředně navazuje na předchozí uvedenou studii (ale vychází také z celé řady dalších studií naší výzkumné skupiny) a ještě dále doplňuje objasněný mechanismus přenosu signálu z domény sensorové do domény funkční v případě histidinkinasy *AfGcHK*. Zde jsme detailně zkoumali roli dimerizačního rozhraní sensorové (globinové) domény při přenosu signálu v *AfGcHK*. Prezентujeme krystalovou strukturu monomerní sensorové domény *AfGcHK* s navázaným imidazolem a s rozlišením 1,8 Å. Detailním rozbořením jsme zjistili, že helixy dimeru sensorové

domény plnodélkové varianty (nezkrácené, přirozené formy) *AfGcHK* jsou pod „napětím“ a že Tyr-15 hraje roli jak v tomto „napětí“, tak v dimerizaci sensorové (globinové) domény. Biofyzikální experimenty odhalily, že zatímco izolovaná sensorová doména *AfGcHK* je v roztoku dimerní, varianty, ve kterých je Tyr-15 nahrazen Ala nebo Gly, jsou monomerní. Navíc jsme zjistili, že ačkoli je dimerizace plnodélkové varianty (nezkrácené, přirozené formy) proteinu zachována prostřednictvím dimerizačního rozhraní funkční (kinasové) domény, ve všech plnodélkových variantách *AfGcHK* nesoucí substituce Tyr15Ala nebo Tyr15Gly se enzymová aktivita blíží nule. Prezentované kombinované strukturní a biofyzikální výsledky ukazují, že Tyr-15 hraje klíčovou roli v dimerizaci sensorové domény *AfGcHK* a že dimerizace této domény je nezbytná pro vnitřní transdukcí signálu a následnou autofosforylaci funkční domény v tomto sensorovém proteinu. Popsaná zjištění poskytují zásadní pohled na mechanismus přenosu signálu histidinkinasy *AfGcHK*, a navíc jsou aplikovatelné také na další zástupce hemových sensorových proteinů, které detekují kyslík (a další plyny). Pro rozvoj studia hemových sensorových proteinů mělo výše zmíněné zjištění naprosto zásadní význam.

dne 30. 4. 2022
doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.